

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-100600

(43)Date of publication of application : 12.04.1994

(51)Int.Cl.

C07K 15/20

C07K 3/02

C07K 3/08

C07K 3/24

(21)Application number : 04-277830

(71)Applicant : SEIWA KASEI:KK
YAMAUCHI KIYOSHI

(22)Date of filing : 22.09.1992

(72)Inventor : YAMAUCHI KIYOSHI

(54) PRODUCTION OF REDUCED KERATIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce a reduced keratin, having a large amount of a high- molecular weight component and a crosslinkable thiol group and suitably usable for producing industrial products, e.g. membranes, films, fibers or sponge in a short time.

CONSTITUTION: A keratin-containing substance is reduced in the presence of a protein denaturing agent or further a surfactant in an aqueous medium while being preferably irradiated with ultrasonic waves and insoluble substances are removed. Salting out is then carried out to precipitate the resultant reduced keratin from the aqueous medium. The obtained precipitate is subsequently isolated.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-100600

(43)公開日 平成6年(1994)4月12日

(51)Int.Cl.⁵

C 0 7 K 15/20

3/02

3/08

3/24

識別記号

庁内整理番号

8517-4H

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-277830

(22)出願日 平成4年(1992)9月22日

(71)出願人 000147213

株式会社成和化成

大阪府東大阪市布市町1丁目2番14号

(71)出願人 592005788

山内 清

大阪府河内長野市北青葉台27-19

(72)発明者 山内 清

大阪府河内長野市北青葉台27-19

(74)代理人 弁理士 三輪 鐵雄

(54)【発明の名称】 還元ケラチンの製造方法

(57)【要約】

【目的】 高分子量成分が多く、かつ架橋可能なチオール基を有し、たとえば膜、フィルム、繊維、スポンジなどの産業用品の製造に好適に使用される還元ケラチンを短時間で製造する。

【構成】 ケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、好ましくは超音波照射のもとに、還元剤により還元し、不溶物を除去した後、塩析して還元ケラチンを水性媒体中から沈殿させて、単離する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤の存在下で、還元剤により還元し、不溶物を除去した後、塩析することを特徴とする還元ケラチンの製造方法。

【請求項2】 ケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、還元剤により還元し、不溶物を除去した後、塩析することを特徴とする還元ケラチンの製造方法。

【請求項3】 超音波照射のもとに還元を行う請求項1または2記載の還元ケラチンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、高分子量成分が多く、かつ架橋可能なチオール基を有する還元ケラチンの製造方法に関する。本発明によって得られる還元ケラチンは、架橋可能なチオール基を有することと、高分子量成分が多いという特性を利用して、たとえば膜、フィルム、繊維、スポンジなどの製造に好適に使用される。

【0002】

【従来の技術】毛髪、獣毛、羽毛などの動物組織中に構造タンパクとして存在するケラチンは、従来から、フィルム、繊維などの産業素材原料として注目されてきた。しかしながら、ケラチンは、通常の溶媒に対して不溶もしくは難溶であるため、溶液状態を経て二次加工に利用するには、加水分解により大幅に短分子量化するか、またはケラチンのジスルフィド結合の還元処理をするか、あるいは生成したチオール基の化学処理（アルキル化反応など）による不可逆的修飾を施さなければ利用することができなかった。

【0003】すなわち、これまで、ケラチンを溶液状態を経て二次加工に利用するには、上記のケラチン含有物質を酸、アルカリまたは酵素により加水分解して短分子量化したケラチン加水分解物の水溶液として利用するか、あるいは還元剤と尿素などの蛋白質変成剤との共用によりケラチンのジスルフィド結合をチオール基に還元して生成した還元ケラチンの水溶液として利用するか、あるいは上記の還元ケラチンのチオール基の再結合防止のためにモノヨード酢酸によりアルキル化誘導体とするか、あるいは亜硫酸ナトリウム／テトラチオン酸ナトリウムにより $S-SO_3^-Na^+$ 化することによって不可逆的に化学修飾したケラチン誘導体の水溶液として利用されてきた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、加水分解により短分子量化したケラチン加水分解物は、分子量が小さいためにフィルムなどに加工したときに強度が劣り、また水中ではすぐ崩壊するなどの問題があった。

チオグリコール酸などの還元剤と尿素などの蛋白質変成剤とからなる可溶化剤を加えて還元抽出した後、透析、限外濾過などによって可溶化剤を除去することが行われているが、この透析や限外濾過は、大量の水、還元剤、蛋白質変成剤などの浪費を引き起こす上に、製造時間と製造費用の増大を引き起こし、しかも過剰の還元剤や蛋白質変成剤の廃棄に伴い公害を引き起こすという問題があった。

【0006】さらに、透析や限外濾過は長時間を要するため、還元により生成したチオール基がそれらの間に酸化されて再結合し、架橋可能なチオール基が失われるという問題があり、また、透析や限外濾過による場合は、還元抽出された還元ケラチンに分子量の低いものが相当量含まれるため、強度面などで天然高分子原料としての長が損なわれてしまうという問題もあった。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記事情に鑑み、ケラチン含有物質から還元抽出された還元ケラチンの単離法の効率化と該還元ケラチン中の高分子量成分の増加について鋭意検討を重ねた結果、ケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、還元剤で還元し、不溶物を遠心または濾過により除去した後、得られた水溶液に塩化ナトリウムや硫酸アンモニウムなどの無機塩を添加して塩析するときは、抽出された還元ケラチンがその還元状態を保持したまま短時間で単離され、高分子量成分が多く、かつ架橋可能なチオール基を有する還元ケラチンが容易に得られることを見出し、本発明を完成するにいたった。

【0008】すなわち、ケラチン含有物質を上記のように水性媒体中で還元すると、還元された還元ケラチンは水性媒体中に溶解し、ケラチンを包んでいたキューティクルなどは不溶物として水性媒体中に存在する。

【0009】そこで、この不溶物を遠心または濾過により除去した後、塩化ナトリウムや硫酸アンモニウムなどの無機塩を添加して溶液のイオン化強度を上げると塩析が生じ、水性媒体中に溶解していた還元ケラチンが還元された状態を保持したまま、つまりケラチンを還元したときに生成したチオール基がほぼ保持された状態で、溶液中から高収率で沈殿する。

【0010】一方、還元剤、蛋白質変成剤、界面活性剤などは、水性媒体中に溶解して水性媒体中に残るので、濾過、遠心分離などにより還元ケラチンを反応液から単離することができる。

【0011】この際、低分子量の蛋白質は水性媒体中に溶解しやすいので、単離された還元ケラチン中には低分子量のものがほとんど含まれず、したがって、高分子量成分の多い還元ケラチンが得られる。

る場合のように還元ケラチン中のチオール基が酸化を受けることが少なく、したがってチオール基がほとんど損なわれることなく保持される。

【0013】上記方法によれば、分子量が30,000~130,000のものを主成分とし、アミノ酸100残基当り4~16個のシステインを有する還元ケラチンが得られる。そして、その収率は人間の毛髪や羊毛を出発原料とする場合35~50%程度であり、羽毛を出発原料とするときは収率が約80%に達する。

【0014】ここで、上記の還元ケラチンがアミノ酸100残基当り4~16個のシステインを有することと、還元ケラチンがその還元状態をほぼ保持したまま、つまり還元により生成したチオール基をほぼ保持した状態で得られることとの関係について説明すると、次の通りである。

【0015】ケラチンは、その含有物質の種類によって多少異なるが、アミノ酸分析すると、一般にアミノ酸100残基当り2~8個のシスチン（ハーフシスチンとしては4~16個）を含んでいる。

【0016】そこで、このケラチンを還元すると、シスチン中のジスルフィド結合（-S-S-結合）が開裂してチオール基（-SH基）になり、シスチンはシステインになる。

【0017】したがって、還元されたケラチンはチオール基を有しているが、従来は長時間を要する透析や限外濾過により還元剤や蛋白質変成剤などの可溶化剤を除去していたため、それらの間にチオール基が酸化を受けて失われていたが、本発明では塩析により還元ケラチンを反応液中から短時間で沈殿させて単離するので、チオール基が酸化を受けることが少なく、還元状態をほぼ保持したまま還元ケラチンが得られる。

【0018】したがって、本発明により得られる還元ケラチンは、その出発物質のケラチン含有物質中のケラチンに応じて、アミノ酸100残基当り4~16個のシステインを有しており、これは還元ケラチンが還元により生成したチオール基をほぼ保持した状態で得られたことに相当する。

【0019】また、ケラチンの分子量は、その含有物質によって多少異なるが、一般に10,000~130,000である。本発明では塩析により還元ケラチンを反応液中から沈殿させて単離するので、水に溶解しやすい低分子量の蛋白質（この中には低分子量の還元ケラチンも含まれる）がほとんど含まれず、分子量30,000~130,000のものを主成分とする高分子量成分の多い還元ケラチンが得られる。

【0020】本発明において還元ケラチンとは、還元工程を経て得られたものをいうが、その還元によりケラチン中のシスチンのすべてが還元されているということ

【0021】そして、上記のようにして得られた還元ケラチンは凍結乾燥法などの手段により粉末にしたり、あるいは必要に応じ少量の界面活性剤と酸化防止のための還元剤を添加した水に溶解することによって、還元ケラチンの水溶液とすることができる。

【0022】本発明において、還元ケラチンを得るにあたり、出発原料として用いるケラチン含有物質としては、ケラチンを含むものであればよく、たとえば人間の毛髪、羊毛、馬毛、牛毛などの獣毛や、鶏などの鳥類の羽毛、牛などの動物の爪や角、ひずめ（蹄）、魚のうろこ（鱗）などを用いることができる。

【0023】上記の水性媒体は、水単独、または水と水混和性の有機溶媒との混合物であってもよく、含水率が50重量%以上、好ましくは80重量%以上の溶媒を用いる。水混和性の有機溶媒としては、たとえばメタノール、エタノールなどの低級脂肪族アルコールなどが挙げられる。

【0024】還元剤は、ケラチン含有物質中のケラチンのジスルフィド結合を還元してチオール基に変換する作用をするものであり、この還元剤としては、たとえば2-メルカプトエタノール、チオグリコール酸、ジチオスレイトール、ジチオエリトリトールなどのチオール化合物；トリプロピルホスフィン、トリブチルホスフィンなどの有機リン化合物；亜硫酸水素ナトリウムなどの還元能力を持つ無機化合物などが挙げられる。

【0025】これらの還元剤の使用量は、通常、ケラチン含有物質10gに対して0.05~0.50モルであり、還元反応の効率と経済性を考慮すると、ケラチン含有物質10gに対して0.05~0.20モルが好ましい。

【0026】蛋白質変成剤は、ケラチン中の水素結合を切断する作用を有するもので、その具体例としては、たとえば尿素、チオ尿素などが好適なものとして挙げられる。そして、爪、ひずめ、うろこなどのように堅い組織のケラチン含有物質を使用する場合には、粉碎した後、蛋白質に対して溶解作用を有する水酸化ナトリウム、アンモニアなどのアルカリを溶解助剤として用いることが好ましい。

【0027】これらの蛋白質変成剤の濃度と使用量は、ケラチン含有物質の溶解性などを考慮して決定するのが適しているが、通常、ケラチン含有物質に対して3~10mol/l濃度のものを5~40倍重量、好ましくは5~8mol/l濃度のものを10~30倍重量である。

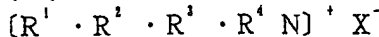
【0028】本発明において、還元工程は、上記のような蛋白質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で行われるが、後者のように界面活性剤を共存させた場合は、還元速度が速くなり、ケラチン含有物質からの還元ケラチンの抽出速度が向上する。ただ

る。

【0029】上記界面活性剤としては、下記のアニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン界面活性剤のいずれも用いることができる。

【0030】アニオン界面活性剤としては、たとえばドデシル硫酸ナトリウムなどのアルキル硫酸塩、アルキル硫酸エステル塩、脂肪酸アルコールリン酸エステル塩、スルホコハク酸エステル塩などのアニオン界面活性剤が挙げられる。

【0031】カチオン界面活性剤としては、たとえば次式で示されるカチオン界面活性剤などが挙げられる。



〔式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 の1個または2個は直鎖もしくは分岐鎖を有する炭素数8~20のアルキル基またはヒドロキシアルキル基であり、残余は水素原子、炭素数1~3のアルキル基もしくはヒドロキシアルキル基またはベンジル基である。 X はハロゲン原子、炭素数1~2個のアルキル硫酸基またはアルキルピリジニウムハライドなどの芳香族四級アミン塩などである〕。

【0032】両性界面活性剤としては、たとえば脂肪族アミンのN-カルボキシメチル体、N-スルホアルキル化体、イミダゾリンスルホン酸などのベタイン系の両性界面活性剤（疎水基は主として炭素数12~14のアルキル基またはアシル基、対イオンはアルカリ金属などである）などが挙げられる。

【0033】ノニオン界面活性剤としては、たとえばポリオキシエチレンアルキルエーテル型、脂肪酸エステル型、ポリエチレンイミン型、ポリグリセリンエーテル型、ポリグリセリンエステル型などのノニオン界面活性剤（疎水基は主として炭素数12~14のアルキル基もしくはアシル基である）などが挙げられる。

【0034】そして、この界面活性剤の還元工程での使用量はケラチン含有物質の5~50重量%が好ましい。

【0035】界面活性剤としては、前記したように、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン界面活性剤のいずれも使用することができるが、なかでもアニオン界面活性剤、たとえばアルキル硫酸塩やポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩などが特に好ましい。

【0036】還元工程の具体的操作は、たとえば次のようにして行われる。すなわち、ケラチン含有物質をその全量が浸るに充分な5~40重量倍の3~10M（mol/l）の蛋白質変成剤水溶液、たとえば尿素の場合には、5~8Mの尿素水溶液に浸漬し、還元剤または還元剤と界面活性剤を加えてから容器を密栓し、室温~100℃で1~24時間加熱攪拌する。

【0037】上記還元工程において、反応系に超音波を照射すると、還元抽出作用を促進することができ、還元

いることができる。超音波照射の強さは反応系の大きさにより異なるが、たとえば反応系の大きさが1リットル以下のときは出力50~200Wで充分である。

【0038】上記の還元工程を経て得られた反応液は、不溶物を含むので、これを遠心分離や濾過により除去した後、塩析により還元ケラチンを沈殿させる。

【0039】塩析は、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの無機塩を上記不溶物除去後の水溶液に加えることによって行われる。この塩析にあたっては、上記水溶液を塩酸などの酸を加えて弱酸性（pH3~5、特に3.5付近が好適）にしておくことが好ましい。また、アセトンやメタノール、エタノールなどの極性有機溶媒を併用添加し、塩析効果を上げてよい。

【0040】この塩析にあたっての無機塩の添加量は、ケラチン素抽出液（キューティクルなどの不溶物を除去したもの）に対して無機塩が0.1~2Mの濃度になるようにすることが適しており、特に0.5~0.7Mの濃度になるようにすることが好ましい。

【0041】塩析時の温度は0℃近辺から40℃の範囲が適しており、塩析に要する時間は短時間で、長くても10分間程度をみておけば充分である。

【0042】上記のようにして固形物として得られた還元ケラチンは、水洗後、必要に応じ凍結乾燥法などにより粉末とするか、あるいはアンモニアなどで弱アルカリ（pH8~9）としつつ還元ケラチンに対して5~50重量%の界面活性剤を含んだ水溶液（酸化防止のために還元剤を少量含有させてもよい）を加えて可溶化して透明な水溶液とすることができる。

【0043】この水溶液中での還元ケラチンの濃度は、使用した界面活性剤を含んだ水溶液の量で0.1~10重量%程度に制御することができるが、抽出と塩析の操作工程を簡便化するため、特に1~5重量%程度にしておくことが好ましい。この水溶液は薄いミルク状になっている場合があるが、この場合はさらに濾過処理することにより、透明度を上げることができる。

【0044】上記のようにして得られた還元ケラチンは、ポリアクリルアミド電気泳動法で分子量を測定すると、原料として用いたケラチン含有物質によって若干異なるが、分子量30,000~130,000のものを80%以上含んでおり、分子量15,000以下のものは実質上含んでいない。

【0045】同じ条件下で抽出された還元ケラチンを透析や限外濾過処理で水溶液として得る方法では、分子量15,000~130,000のものを主成分としているものの、分子量15,000以下のものが0.5~1割程度混在している。そのため、後記の試験例で明らかにするように、フィルム化した時の強度は本発明の還元

ミノ酸分析すると、原料として使用したケラチン含有物質によって若干変動するものの、アミノ酸100残基当りシステインを4~16個有している。

【0047】本発明の方法により還元ケラチンの製造に要する時間は、透析や限外濾過処理による既知の方法に比べて、大幅に短縮することができる。たとえば、上記既知の方法では、100mlのケラチン抽出液につき透析や限外濾過に10~50時間程度要するが、本発明の方法による場合、塩析は短時間で終わるので、大幅な時間短縮を達成できる。

【0048】また、本発明により還元ケラチンを製造する場合は、尿素などの蛋白質変成剤の回収と再使用が容易である。すなわち、従来の透析や限外濾過では、還元ケラチンと蛋白質変成剤や残余の還元剤などを大量（単離還元ケラチン1g当り1~2リットル）のしかもイオン交換水や蒸留水などの清浄な水を使用して分離するため、蛋白質変成剤などは大量の水に溶解しており、その回収、再使用がきわめて困難であり、また、その廃水処理にあたって大規模な公害対策も必要になる。

【0049】これに対して、本発明では水道水を使用することができ、しかもその消費量は単離還元ケラチン1g当り約0.2リットルと格段と少なく、蛋白質変成剤などの回収と再使用が容易である。もとより、本発明によれば、水の大量使用の必要がなく、水の浪費がない。

【0050】

【実施例】つぎに、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はそれらの実施例のみに限定されるものではない。

【0051】実施例1

羊毛（Collidale種より採取）20gを5M尿素水溶液550gに浸漬し、2-メルカプトエタノール25mlを添加した後、容器を密栓し、60℃にて24時間振盪攪拌した。反応液を室温に戻し、不溶物を濾過により除去した後、濾液を塩酸でpH5に調整し、その後、硫酸ナトリウム55gを添加して塩析し、密栓、攪拌した後、遠心分離した。

【0052】得られた白色沈殿物を2-メルカプトエタノールを0.3重量%含む水で洗浄し、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）3gと2-メルカプトエタノール0.6gを添加した水200mlを加え、アンモニアでpH8~9に調整しつつ、溶解した。

【0053】この水溶液10gをLowry法により蛋白定量したところ、0.35gの還元ケラチンを含んでおり、この水溶液中の還元ケラチン濃度は3.5重量%であって、収率は35%であった。また上記水溶液を凍結乾燥して得た還元ケラチン粉末のアミノ酸分析を行ったところ、アミノ酸100残基当りシステインが8.4個、シスチンが1.5個であった。

0,000から60,000のものが約90%であり、分子量30,000未満のものは5%以下であった。

【0055】実施例2

羊毛（Collidale種より採取）4gを5M尿素水溶液130mlに浸漬し、2-メルカプトエタノール6mlを添加した後、容器を密栓、攪拌し、約50℃で5時間、200Wの出力にて超音波照射した。反応液を室温に戻し、不溶物を濾過により除去した後、濾液を塩酸で弱酸性（pH5）にし、硫酸ナトリウム13gを添加すると共に攪拌すると、塩析により還元ケラチンが沈殿した。

【0056】沈殿物を遠心分離で液から分離し、得られた還元ケラチンを2-メルカプトエタノールを0.3重量%含む水で水洗した後、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）0.75gと2-メルカプトエタノール0.6gを添加した水100mlに溶解した。

【0057】この水溶液10gをLowry法により蛋白定量したところ、0.2gの還元ケラチンを含んでおり、水溶液中の還元ケラチン濃度は2重量%であって、収率は約50%であった。また上記水溶液を凍結乾燥して得た還元ケラチン粉末のアミノ酸分析を行ったところ、アミノ酸100残基当りシステインが8.5個であった。

【0058】また、上記還元ケラチン粉末の分子量をポリアクリルアミド電気泳動法で調べたところ、分子量30,000から120,000のものが90%以上であり、分子量30,000未満のものは5%以下であった。

【0059】比較例1

羊毛（Collidale種より採取）20gを8M尿素水溶液370gに浸漬し、ドデシル硫酸ナトリウム12gと2-メルカプトエタノール35mlを添加した。ついで容器を密栓し、60℃にて24時間振盪攪拌した。反応物を室温に戻し、不溶物を濾過により除去した。濾液をセロファンチューブに入れ、2-メルカプトエタノールを0.2重量%溶解させたイオン交換水7リットルに対してそれぞれ24時間ずつかけて2回透析した。

【0060】得られた無色透明の透析液の蛋白定量をLowry法により行ったところ、透析液10gにつき0.23gの還元ケラチンを含んでおり、液中の還元ケラチンの濃度は2.3重量%であった。

【0061】また、上記水溶液を凍結乾燥して得た還元ケラチン粉末の分子量をポリアクリルアミド電気泳動法で調べたところ、分子量15,000~70,000のものが主成分であって全体の約80%を占めていたが、分子量24,000以下のものを約20%含有していた。また、還元ケラチン粉末のアミノ酸分析を行ったと

【0062】試験例1

実施例1～2および比較例1で得られた還元ケラチンの水溶液それぞれ6mlに75重量%グリセリン水溶液0.2mlを加え、それらをそれぞれ別々に水平な底面を持つ円形ガラス容器（直径6cm）に流し、室温、大気中で乾燥した。その後、80～90℃で15分間加熱処理した後、水中に入れ、ガラス容器から剥離してきた還元ケラチンのフィルムを取り出した。

【0063】得られたフィルムの強伸度をオートグラフ*

*により測定した。その結果を表1に示す。なお、測定にあたっての試料の調整および測定条件は次の通りである。

【0064】試料：得られたフィルムを風乾した後、80℃で20分間熱処理し、その後、室温まで戻す。

【0065】測定条件：相対湿度65%の雰囲気中、引張速度200mm/minで測定する。

【0066】

【表1】

フィルム	厚さ	強 伸 度	ヤ ン グ 率
実施例1	39 μm	1.28 kg/mm ²	28 kg/mm ²
実施例2	37 μm	1.35 kg/mm ²	27 kg/mm ²
比較例1	40 μm	1.09 kg/mm ²	23.6 kg/mm ²

【0067】表1に示すように、実施例1～2で製造した還元ケラチンから作製したフィルムは、比較例1で製造した還元ケラチンから作製したフィルムに比べて、強伸度が大きい。

【0068】

【発明の効果】本発明によれば、高分子量成分が多く、

かつ架橋可能なチオール基を有する還元ケラチンを短時間で製造することができる。

【0069】そして、得られた還元ケラチンは、架橋可能なチオール基を有することと、高分子量成分が多いという特性を利用して、たとえば膜、フィルム、繊維、スポンジなどの産業用品の製造に好適に使用できる。